

PCT/JP98/04609

28.10.98

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECT 18 DEC 1998

WIPO

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年10月15日

出願番号
Application Number:

平成 9 年特許願第 281659 号

出願人
Applicant(s):

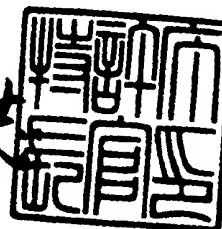
旭化成工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



【書類名】 特許願

【整理番号】 X09-01240

【提出日】 平成 9年10月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 37/02

【発明の名称】 トロンボモジュリン水溶液注射用製剤

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 横沢 彰

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 村田 智代

【特許出願人】

【識別番号】 0000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代表者】 山本 一元

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンボモジュリン水溶液注射用製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5～7.0において緩衝能を有する緩衝液成分と界面活性剤とを含有し、pH5～7.0であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れた水溶液注射用製剤。

【請求項2】 可溶性トロンボモジュリンが、配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリンである請求項1に記載の水溶液注射用製剤。

【請求項3】 緩衝液成分が、リン酸塩緩衝液成分、又は酢酸塩緩衝液成分の少なくとも1つであることを特徴とする請求項1又は2に記載の水溶液注射用製剤。

【請求項4】 緩衝液のpHが、5.5～6.5であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の水溶液注射用製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、可溶性トロンボモジュリンを有効成分とする長期安定性および振盪安定性において優れた水溶液注射用製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

トロンボモジュリンは、トロンビンと特異的に結合し、トロンビンによるプロテインCの活性化を著しく促進する作用を有する物質である。プロテインCは、血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンK依存性のたん白質であり、トロンビンの作用により活性化され、活性型プロテインCとなる。この活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系因子の活性型第V因子、および活性型第VII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている〔鈴木宏治、医学のあゆみ、第125巻、901頁（1983年）〕。

【0003】

したがって、トロンボモジュリンは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に生産せしめるものであり、抗血液凝固剤又は血栓溶解剤として有用であるとされている。

従来、トロンボモジュリンは、ヒトを始めとする種々の動物種の血管内皮細胞上に発現している糖たん白質として発見取得されたが、発明者らのグループにより、始めてクローニングに成功した。即ち、遺伝子工学的手法を用いてヒト肺cDNAライブラリーから、シグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、そしてトロンボモジュリンの全遺伝子配列を解析し、18アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む575残基のアミノ酸配列が明らかにされている（特開平1-6219号公報）。シグナルペプチドが切断されたマチュアなトロンボモジュリンは、そのマチュアなペプチドのN末端側よりN末端領域（1-226番目）、6つのEGF様構造をもつ領域（227-462番目）、O型糖鎖付加領域（463-498番目）、膜貫通領域（499-521）、そして細胞質内領域（522-557番目）の5つの領域から構成されており、そして全長のトロンボモジュリンと同じ活性を有する部分（即ち、最小活性単位）は、6つのEGF様構造をもつ領域のうちN末端側から4、5、6番目のEGF様構造からなる部分であることが知られている〔M. Zushiら、J. Biol. Chem., 246, 10351-10353（1989）〕。

【0004】

少なくとも、膜貫通領域を含有しないように調製されたトロンボモジュリンにおいては、界面活性剤の非存在下でも綺麗に溶解することができる性質（以下、可溶性ということがある）を有し、例えば、N末端領域と6つのEGF様構造をもつ領域とO型糖鎖付加領域の3つの領域のみからなる（即ち、配列番号1の19～516位のアミノ酸配列からなる）トロンボモジュリンは、組換え技術の応用により取得できること、そしてその組換え体トロンボモジュリンは、天然のトロンボモジュリンの活性を有していることが確認されている（特開平1-6219号公報）。

【0005】

因みに、遺伝子においては、自然の変異または取得時の変異により、多くのケースで認められる通り、ヒトにおいても多形性の変異が見つけられており、上述の575残基のアミノ酸配列からなるヒトトロンボモジュリン前駆体の第473位のアミノ酸においてValであるものと、Alaであるものが現在確認されている。このアミノ酸をコードする塩基配列においては、第1418位において、それぞれTとCとの変異に相当する〔Wenら、Biochemistry 26, 4350-4357 (1987)〕。しかし、活性及び物性においては、全く相違なく、両者は実質的に同一と考えることができる。したがって、上述の配列番号1のアミノ酸配列からなるトロンボモジュリンは、配列番号2のアミノ酸配列からなるトロンボモジュリンの多形性のペプチドであり、実質的に同一と判断できる。

【0006】

ところで、このトロンボモジュリンは、医薬組成物として広く安定的に供給するために、凍結乾燥製剤となす試みが行われている。この凍結乾燥の過程で、トロンボモジュリン含有溶液を凍結乾燥すると、微量ではあるが一部が変性によって高分子化し、トロンボモジュリン分子がいくつか会合した多量体が生成することが明らかとなった。この課題を解決するために、本発明者らは、鋭意検討した結果、アミノ酸またはその塩類を添加することにより、凍結乾燥時のトロンボモジュリンの変性が防止されることを確認し、先に出願した（特開平6-321805号公報）。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

凍結乾燥製剤以外に、簡便に用いることができ、また製造費用の安価な新たな製剤を提供することが求められた。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、凍結乾燥製剤以外の新たな製剤を開発する目的で、凍結乾燥工程を行わずに、用時溶解する必要のないトロンボモジュリンの水溶液注射用製剤

の開発を検討した。トロンボモジュリンの水溶液注射用製剤に必要とされる品質としては、先ず第一に、5℃から室温での長期保存において残存力価が大きく下がらないこと（長期安定性）が必要であるが、調べてみると、必ずしもこの長期安定性を得ることは容易ではなかった。またさらに意外なことに、水溶液注射用製剤を振盪したときに、白濁を生ずる場合があることが確認された。輸送等において、程度の差はあっても、製剤が振盪されることは十分に予想され、従来の粉体である凍結乾燥製剤においては全く問題とならず、予想もされなかった課題に至った。注射剤において、不溶物が存在することは、特に循環器疾患を有する患者にとって致命的な問題を引き起こす可能性があり、振盪により白濁して不溶物が生ずる問題は極めて大きな問題と把握される。したがって、新たに振盪に対する安定性（振盪安定性）も十分に解決されるべき必要がある課題であることが本発明者により確認された。

【0009】

以上まとめると、水溶液注射用製剤は、凍結乾燥製剤に比べると使用時における注射用蒸留水への溶解の必要もなく簡便に投与でき、また製造工程で凍結乾燥操作を必要とせず製造上経済的であるなどの利点があるが、上述の通り、トロンボモジュリンは溶液状態では長期安定性に劣り、振盪安定性についても必ずしも満足のいくものではなかった。

【0010】

出願人らは前記の問題を解決するために鋭意研究を行った結果、特定の条件によりこれらの安定性に関する問題点をことごとく解決できることを確認して、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5～7.0において緩衝能を有する緩衝液成分と界面活性剤とを含有し、pH5～7.0であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れた水溶液注射用製剤である。

【0011】

本発明でトロンボモジュリンとは、トロンピンに結合し、トロンピンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する物質であれば特に限定されず、また

、可溶性トロンボモジュリンとは、上記のトロンボモジュリンとしての活性を有し、界面活性剤の非存在下でも容易に溶解し得る物質であり、例えば、注射用蒸留水に対して、少なくとも 1 mg/ml 、好ましくは 3 mg/ml の溶解性が得られるものが好ましい。可溶性トロンボモジュリンとしては、例えば、トロンボモジュリンの最小活性単位である、6つのEGF様構造を持つ領域のうちのN末端側から4、5、6番目の構造（即ち、配列番号1および配列番号2の367-480位を少なくとも有するアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。このなかで特に好ましい可溶性トロンボモジュリンとしては、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAをベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製される形質転換細胞が産生し得るペプチドが挙げられる。この形質転換細胞が産生し得るペプチドとしては、配列番号1および配列番号2の19-516位のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい例として挙げられる。その他に宿主細胞によっては、シグナル部分がそのままや、前記配列番号1および配列番号2の17-516位のアミノ酸配列からなるペプチド、又はそれらの混合物であってもよい。勿論これらのペプチドは極めて溶解性が高いもので、前述の溶解性を十分に有するものである。さらに、これらのペプチドは、前記のアミノ酸配列を有すればよいのであって、糖鎖が付いていても、又付いていなくともよく、特に限定されるものではない。また、宿主細胞の種類により、糖鎖の種類や、付加位置や付加の程度は相違するものであり、いずれも用いることができる。

【0012】

宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、VERO（ATCC CCL-81）細胞、BHK細胞、イヌ腎由来MDCK細胞、ハムスターAV-12-664細胞等が、またヒト由来細胞としてHeLa細胞、WI38細胞、ヒト293細胞等が挙げられる。CHO細胞においては、DHFR⁻ CHO細胞がさらに好ましい。

【0013】

また、遺伝子操作の過程において、大腸菌等の微生物も多く使われ、それぞれに適した宿主-ベクター系を使用することが好ましく、上述の宿主細胞において

も、適宜のバクター系を選択することができる。

遺伝子組換え技術に用いるトロンボモジュリンの遺伝子は、クローニングされており、そしてトロンボモジュリンの遺伝子組換え技術を用いた製造例が開示されており、さらにはその精製品を得るための精製方法も知られている（特開平1-6219、特開平2-255699、特開平5-213998、特開平5-310787、特開平7-155176、J. Biol. Chem., 264, 10351-10353, 1989）。したがって本発明のトロンボモジュリンは、上記の報告に記載されている方法を用いることにより、あるいはそれらに記載の方法に準じることにより製造することができる。例えば特開平1-6219号では、全長のトロンボモジュリンをコードするDNAを含むプラスミドpSV2TMJ2を含む、*Escherichia coli* K-12 strain DH5 (ATCC 寄託番号67283号)を開示しているが、出願人らは、再度、同じ菌株 (*Escherichia coli* DH5/pSV2TMJ2) を生命研に寄託した (FERM BP-5570)。この全長のトロンボモジュリンをコードするDNAを原料として、公知の遺伝子操作技術によって、本発明のトロンボモジュリンを調製することができる。

【0014】

本発明に用いられる可溶性トロンボモジュリンは、従来公知の方法またはそれに準じて調製すればよいが、例えば、前記山本らの方法（特開平1-6219号、実施例参照）、又は特開平5-213998号公報を参考にすることができる。すなわちヒト由来のトロンボモジュリン遺伝子を遺伝子操作技術により、例えば、配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAとなし、さらに必要に応じた改変を行うことも可能である。この改変としては、例えば、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAとなすために、配列番号1のアミノ酸配列の第473位のアミノ酸をコードするコドン（特に、第1418位の塩基）に、メソッドイン エンザイモロジー (Method in Enzymology)、第100巻、第468頁（1983年）、アカデミックプレス (Academic Press) に記載の方法に従って、部位特異的変異を行う。例えば、配列番号3の塩基配列を含むDNA断片及び配列番号5に示された塩基配列を有する変異用合成DNAを用い、上記部位特異的

変異を行い、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAとなすことができる。このようにして、調製したDNAを、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、適宜選択し、この細胞を培養して得た培養液から、公知の方法により精製された可溶性トロンボモジュリンが製造できる。前述の通り配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAを前記宿主細胞にトランスフェクトすることが好ましい。本発明に用いられるトロンボモジュリンの生産方法は、上記の方法に限定されるものではなく、すなわち、体液等から抽出精製することでも可能であるし、又トロンボモジュリンを生産する組織またはこれら組織培養液等から抽出精製することも、又必要によりさらに蛋白分解酵素により切断処理することも可能である。

【0015】

次いで上記により取得された培養上清、または培養物からのトロンボモジュリンの単離精製方法は、公知の手法〔堀尾武一編集；蛋白質・酵素の基礎実験法〕に準じて行なうことができる。例えば、トロンボモジュリンと逆の電荷を持つ官能基を固定化したクロマトグラフィー担体と、トロンボモジュリンの間の相互作用を利用したイオン交換クロマトグラフィーの使用も好ましい。また、トロンボモジュリンとの特異的親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーも好ましい例として挙げられる。吸着体の好ましい例として、トロンボモジュリンのリガンドであるトロンピンやトロンボモジュリンの抗体を利用する例が挙げられる。これらの抗体としては、適宜の性質、或いは適宜のエピトープを認識するトロンボモジュリンの抗体を利用することができ、例えば、特公平5-42920号公報、特開昭64-45398号公報、特開平6-205692号公報などに記載された例が挙げられる。また、トロンボモジュリンの分子量サイズを利用した、ゲル濾過クロマトグラフィーや限外濾過が挙げられる。そしてまた、疎水性基を固定化したクロマトグラフィー担体と、トロンボモジュリンのもつ疎水性部位との間の疎水結合を利用した疎水性クロマトグラフィーが挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせることができる。精製の程度は、使用目的等により選択できるが、例えば電気泳動、好ましくはSDS-PAGEの結果が単一バンドとして得られるか、もしくは単離精製品のゲル濾過HPLCまたは逆相HPLCの

結果が単一のピークになるまで純粋化することが望ましい。

【0016】

精製法を具体的に例示すれば、トロンボモジュリン活性を指標に精製する方法が挙げられ、例えばイオン交換カラムのQ-セファローズFFで培養上清または培養物を粗精製しトロンボモジュリン活性を有する画分を回収し、ついでアフィニティークラムのDIP-TB (diisopropylphosphoryl thrombin agarose) で主精製しトロンボモジュリン活性が強い画分を回収し、回収画分を濃縮し、ゲルろ過にかけトロンボモジュリン活性画分を純品として取得する精製方法 [五味ら; Blood, 75, 1396-1399, 1990] が挙げられる。指標とするトロンボモジュリン活性としては、例えばトロンビンによるプロテインC活性化の促進活性が挙げられる。その他に、好ましい精製法を例示すると以下の通りである。

【0017】

トロンボモジュリンと良好な吸着条件を有する適当なイオン交換樹脂を選定し、イオン交換クロマト精製を行なう。特に好ましい例としては、0.18M NaClを含む0.02Mトリス塩緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したQ-セファローズFFを用いる方法である。適宜洗浄後、例えば0.3M NaCl含む0.02Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で溶出し粗精製品のトロンボモジュリンを得ることができる。

【0018】

次に、例えばトロンボモジュリンと特異的親和性を持つ物質を樹脂に固定化しアフィニティークロマト精製を行なうことができる。好ましい例としてDIP-トロンビン-アガロースカラムの例と、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムの例が挙げられる。DIP-トロンビン-アガロースカラムは、予め、例えば、100mM NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液 (pH 7.4) で平衡化せしめ、上記の粗精製品をチャージして、適宜の洗浄を行い、例えば、1.0M NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液 (pH 7.4) で溶出し精製品のトロンボモジュリンを取得することができる。また抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラム

においては、予めCNBrにより活性化したセファロース4B（ファルマシア社）に、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体を溶解した0.5M NaCl含有0.1M NaHCO₃緩衝液（pH 8.3）に接触させ、セファロース4Bに抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体をカップリングさせた樹脂を充填したカラムを、予め例えば1.0M NaCl含む20mMリン酸塩緩衝液（pH 7.3）で平衡化し、適宜の洗浄の後、例えば、0.3M NaCl含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.0）にて溶出せしめる方法が例示される。

【0019】

さらに好ましくは、例えば、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）で平衡化せしめたSP-セファロースカラムに、上記の精製品をチャージする。トロンボモジュリンの種類によるが、通常は、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）で洗浄を開始し、洗浄液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの洗浄液を得、適当な緩衝液で中和し、高純度精製品として取得することができる。また、100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）で平衡化し、次いで精製品をチャージし、100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）で洗浄し、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）で溶出し、溶出液を適当な緩衝液で中和し、高純度精製品として取得することもできる。これらは、限外濾過により濃縮することが好ましい。

【0020】

さらに、ゲル濾過による緩衝液交換を行なうことも好ましい。例えば、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液（pH 7.3）で平衡化せしめたSepacryl S-300カラムもしくはS-200カラムに、限外濾過により濃縮した高純度精製品をチャージし、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液（pH 7.3）で展開分画し、トロンピンによるプロテインCの活性化の促進活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得することができる。

【0021】

多くの精製工程においては、塩類を含有する溶出液等を用いることから、最終的に本発明に合致するpHや緩衝液成分や界面活性剤を含む溶液を用いることができれば、特に、最終的に添加や調製を必要とせず、本発明の水溶液注射用製剤となるが、通常は、可溶性トロンボモジュリンに本発明に必要な成分等を追加することが好ましい。

【0022】

また本発明における緩衝液成分は、pHを5～7.0に調整でき、同pHにおいて緩衝能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、リン酸や、カルボン酸及び／又はその水溶性塩からなる群から選ばれた一種以上の有効量が用いられる。カルボン酸及び／又はその水溶性塩としては、例えば酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、フマル酸、リンゴ酸及び／又はその水溶性塩からなる群から選ばれた一種以上が挙げられ、特に好ましくはリン酸、酢酸及び／又はその水溶性塩などが挙げられる。

【0023】

水溶性塩としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。

上記のpHにおいて緩衝能を有する緩衝液成分は、その種類その他、その濃度とも関係するが、例えば、サルファ処理した1mlのガラスアンプルに検討する緩衝液1mlを充填して熔封し、測定法1に記載の50℃96時間の加熱処理を行った後のpHの変動が±0.3以内に抑制できる緩衝液成分の種類又はその濃度であることが好ましい。前述の代表的な緩衝液成分において、使用される濃度としては、通常0.1mM以上、好ましくは1mM以上が例示され、上限としては、通常は、1000mM以下、好ましくは200mM以下、特に好ましくは25mM以下又は20mM以下が例示される。

【0024】

本願発明の水溶液注射用製剤のための緩衝液の作製方法の例としては、リン酸塩緩衝液の場合には、リン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4 、又はその2水塩)の所定の濃度の水溶液とリン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4 、又はその12水塩)の所定の濃度の水溶液とを、所定量ずつ混合して目的とするpHに調整

する。またはリン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4 、又はその2水塩) の所定の濃度の水溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、目的とするpHに調整してもよい。またpHの微調整のために、薄めたリン酸を滴下してもよい。酢酸塩緩衝液で代表されるカルボン酸塩緩衝液の場合には、酢酸の所定の濃度の水溶液と酢酸ナトリウムの所定の濃度の水溶液とを、所定量ずつ混合して目的とするpHに調整する。または酢酸の所定の濃度の水溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、目的とするpHに調整してもよい。またpHの微調整のために、薄めた酢酸を滴下してもよい。

【0025】

本発明の水溶液注射用製剤のpHは5～7.0であり、好ましくはpH5.5～6.5である。また、特に好ましくは約pH6が挙げられる。

リン酸塩緩衝液においては、その濃度を0.2～200mMの広い濃度範囲で振ったところ、pH7.3では緩衝液濃度による影響があり、濃度が濃くなるほど力価の低下が見られ、例えば200mMでは大きく残存力価を減少させ、熱安定性において好ましい品質とならない可能性があるが、pHを5～7.0の範囲に管理すれば、熱安定性において好ましい品質となる。

【0026】

酢酸塩緩衝液においては、その濃度を0.2～200mMの広い濃度範囲で振っても、緩衝液濃度による影響はなく、またリン酸塩と酢酸塩を組み合わせた緩衝液においては、pH5～7.0の範囲において熱安定性において好ましい品質となる。

また酢酸以外のカルボン酸塩緩衝液においても、酢酸塩緩衝液と同じ濃度、pH範囲で酢酸塩緩衝液と同等の熱安定性を示す。またリン酸塩緩衝液に更に酢酸塩緩衝液成分やカルボン酸塩緩衝液成分を添加しても、同等の熱安定性を示す。

【0027】

また本発明における界面活性剤としては、例えばポリソルベート類 [ポリソルベート80 (商品名: Tween 80)、ポリソルベート20 (商品名: Tween 20) など]、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類 [ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60 (商品名: HCO-60、商品名: クレモフォールRH60)、

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50（商品名：HCO-50、商品名：クレモフォールRH50）など]、ポリオキシエチレンヒマシ油類[商品名：CO-60TX、商品名：CO-50TX、商品名：クレモフォールELなど]、エチレンオキサイドプロピレンオキサイド重合体[ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（商品名：プルロニックF68）など]、セスキオレイン酸ソルビタンが挙げられる。これらの界面活性剤は、複数を混合して用いてもよく、上記の群から選ばれた一種以上を用いることができる。

【0028】

振盪安定性において、ポリソルベート80（商品名：Tween80）は少なくとも0.01%で、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（商品名：HCO-60）及びポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（商品名：プルロニックF68）は少なくとも0.1%で白濁防止効果を示す。ポリソルベート80（商品名：Tween80）は0.01%添加でも白濁防止効果を示し、特に好ましい例として挙げられる。

【0029】

本発明で用いる界面活性剤の濃度は、通常0.001%以上、好ましくは0.01%以上が例示され、上限としては、通常1%以下、好ましくは0.1%以下が例示される。

上記添加物の他に本発明においては、第3成分として、等張化剤（例えば、塩化ナトリウムなど）、防腐剤（例えばパラオキシ安息香酸エステル類など）等を添加してもよい。

【0030】

前述の通り、添加方法は特に限定されないが、例えば、添加物を直接トロンボモジュリン含有溶液に添加する方法、またはあらかじめ添加物を水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液に溶解して添加する方法などが挙げられる。

また、例えば製剤化工程においては、アンプルまたはバイアルに、水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液1mlあたり0.05～15mg、好適には0.1～5mgのトロンボモジュリン及び上記添加物を含有する溶液を、例えば0.5～10ml充填し、常法により水溶液注射用製剤として調製できる。

【0031】

本願発明の水溶液注射用製剤としてしては、好ましくはアンプル、特に好ましくはサルファ処理アンプルを用いるとよい。サルファ処理アンプルとは、 SO_2 ガスを接触させるか、または好ましくは硫酸アンモニウム水溶液を吹きつけた後、加熱処理して作成される。通常、1～10%の硫酸アンモニウム水溶液を吹きつけた後、630～700℃で加熱処理する方法が例示される。通常、これらは使用する前に、アンプル洗浄機等により、水を付加した状態で超音波処理後水洗浄し、ついで、乾燥滅菌のために300～350℃程度で数分間加熱せしめることにより使用されるものである。

【0032】

かくして得られる水溶液注射用製剤は、長期安定性として、5℃で少なくとも2年間、好ましくは3年間、約80%以上の力価を保持できるものであって、また25℃で振幅5cm、180往復/分の振盪条件において、白濁を生ずることがないものである。

このような水溶液注射用製剤としては、例えば1日1～3回投与として0.01～100mg含有した注射用水溶液として得ればよい。

【0033】

この水溶液注射用製剤の急性毒性を調べたところ、各群5匹の雌雄SDラットを用いて、トロンボモジュリン量として180mg/kgの用量で静脈内投与しても死亡例は1例も見られなかった。

【0034】

【実施例】

以下、実施例及び比較例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

【0035】

【参考例】本実施例で用いる可溶性トロンボモジュリンの生産

【0036】

【参考例1】

実施例に用いる可溶性トロンボモジュリンは、前記山本らの方法（特開平1-

6219号の実施例10に記載の方法)に従って行った。すなわち配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAを、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、この細胞の培養により可溶性トロンボモジュリンの生産を行った。

【0037】

【参考例2】

強陰イオン交換樹脂カラムによる粗精製

参考例1で取得した-20℃凍結培養上清11Lを溶解し、0.2 μ mのメンブレンフィルター(ミリポア社、ミリパック20)で濾過した。

濾過した培養上清については、150mM NaClを含む20mMトリス塩緩衝液(pH7.4)で平衡化したQ-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径90mm、高さ6.5cm)に供した。次に180mM NaClを含む20mM酢酸塩緩衝液で洗浄し、更に180mM NaClを含む20mMトリス塩緩衝液(pH7.4)で洗浄を行ない、300mM NaClを含む20mMトリス塩緩衝液(pH7.4)で溶出を開始し、溶出液の吸光度280nmのピーク立ち上がりからの0.5カラムボリューム容量の溶出液を粗精製品として取得した。

【0038】

【参考例3】

アフィニティーカラム(トロンビンカラム)による主精製

参考例2で得られた溶出画分400mlを100mM NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)に対して透析した。透析後、100mM NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)で平衡化したDIP-トロンビン-アガロース(PAESE LOREI社、06-148-1035、直径50mm、高さ6cm)に供した。200mM NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)で洗浄後、1.0M NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)で溶出を開始し、溶出液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を主精製

品として取得した。

【0039】

【参考例4】

アフィニティーカラム（抗体B）による主精製

アフィニティーカラムは以下のように作製した。即ち、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体Bは、その抗体を産生するハイブリドーマを培養することにより得た培養上清、あるいは、ハイブリドーマを組織適合性動物、ヌードマウス等の腹腔内にて増殖させて得た腹水より、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラム等の分離精製操作により精製した。次に、ファルマシア社のマニュアル（Affinity Chromatography principles & methods）に従い、精製抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体Bを 0.5M NaCl 含有 0.1M NaHCO₃ 緩衝液（pH 8.3）に溶解し、CNBr-activated Sepharose 4B（ファルマシア社、52-1153-00-AI）と接触反応させ、セファローズ4Bに抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体Bをカップリングし、抗トロンボモジュリンモノクローナル（抗体B）結合 Sepharose 4B を作製した。次いでこの抗トロンボモジュリンモノクローナル（抗体B）結合 Sepharose 4B をカラムに充填しモノクローナル（抗体B）カラムを作製した。

【0040】

参考例2で得られた溶出画分400mlを、1.0M NaCl 含む20mM リン酸塩緩衝液（pH 7.3）で平衡化したモノクローナル抗体（抗体B）カラム（直径50mm、高さ6cm）に供した。1.0M NaCl 含む20mM リン酸塩緩衝液（pH 7.3）を流し、更に100mM 酢酸塩緩衝液を流し洗浄し、0.3M NaCl 含む100mM グリシン塩酸緩衝液（pH 3.0）で溶出を開始し、溶出液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を主精製品として取得した。

【0041】

【参考例5】

強陽イオン交換樹脂カラムによる高純度精製

1. トロンビンカラム溶出液の精製 (SP非吸着画分)

参考例 3 で得られた溶出液 200 ml に 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) を加え希釈した液を、次に 1.0 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.0) で pH 3.5 に調製した。この希釈 pH 調製した溶出液を 300 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で平衡化した SP-Sepharose (ファルマシア社) カラム (直径 26 mm、高さ 3 cm) に供した。300 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で洗浄を開始し、洗浄液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりから立ち下がりまでの洗浄液を得、直ちに 500 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で pH 7 に中和し、中和した洗浄液を高純度精製品として取得した。

【0042】

2. モノクローナル抗体カラム溶出液の精製 (SP非吸着画分)

参考例4で得られた溶出液180mlを1.0Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)にてpH3.5に調製した液を、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で平衡化したSP-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径26mm、高さ3cm)に供した。300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で洗浄を開始し、洗浄液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの洗浄液を得、直ちに500mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)でpH7に中和し、中和した洗浄液を高純度精製品として取得した。

【 0 0 4 3 】

3. トロンビンカラム溶出液の精製 (SP吸着画分)

参考例 3 で得られた溶出液 200 ml に 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) を加え希釈した液を、次に 1.0 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.0) で pH 3.5 に調製した。この希釈、pH 調製した液を、100 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で平衡化した SP-Sepharose (ファルマシア社) カラム (直径 26 mm、高さ 3 cm) に供した。100 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で洗浄し、300 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で

5) で溶出し、溶出液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、直ちに 500 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で pH 7 に中和し、中和した溶出液を高純度精製品として取得した。

【0044】

4. 抗体カラム溶出液の精製 (SP 吸着画分)

参考例 4 で得られた溶出液 180 ml に 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) を加え希釈した液を、次に 1.0 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.0) で pH 3.5 に調製した。この希釈、pH 調製した液を、100 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で平衡化した SP-Sepharose (ファルマシア社) カラム (直径 26 mm、高さ 3 cm) に供した。100 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で洗浄し、300 mM NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出し、溶出液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、直ちに 500 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で pH 7 に中和し、中和した溶出液を高純度精製品として取得した。

【0045】

【参考例 6】

ポリスルホン中空糸による高純度精製品の濃縮

参考例 5 で得られた高純度精製品をそれぞれ、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で湿潤化した 1 m のポリスルホン中空糸 (旭化成工業) を用い濃縮し、それぞれ 5 ml の濃縮液を取得した。

【0046】

【参考例 7】

ゲル濾過カラムによる高純度精製品の緩衝液交換

参考例 6 で得られたそれぞれの濃縮液 5 ml を、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で平衡化したそれぞれの Sepharose 1 S-300 カラム (ファルマシア社、直径 16 mm、高さ 90 cm) に供した。50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) で展開し分画した。各画分は測定法 1 のトロンビンによるプロテイン C 活性化を促進する

活性の測定法方により活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得した。

【0047】

以下の実施例では、参考例2、4、5の2、6、7の順により精製したトロンボモジュリン高純度精製品を用いた。また緩衝液成分の濃度を調整する場合やリン酸塩緩衝液以外の緩衝液成分を用いる場合には、上記で得られた高純度精製品を各緩衝液に対して透析して、緩衝液成分を交換した。

【0048】

【参考例8】

配列番号1の367-480位の114個のアミノ酸からなるトロンボモジュリンは以下のように取得した。すなわち特開平5-213998号の実施例1-(1)-(b)に記載の方法で取得したプラスミドを、実施例1-(2)に記載の方法に従って細胞へトランスフェクションし、実施例3-(3)に記載の方法に従って精製し、更に緩衝液交換して高純度精製品を取得した。

【0049】

【実施例1】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を0.2mMに調整し、ポリソルベート80(商品名:Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0050】

【実施例2】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を0.2mMに調整し、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60(商品名:HC0-60)を0.1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0051】

【実施例3】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0052】

【実施例4】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60 (HCO-60) を0.1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0053】

【実施例5】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を200mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0054】

【実施例6】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを5.5に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0055】

【実施例7】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0056】

【実施例 8】

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸塩緩衝液濃度を 2 mM に調整し、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加し、 pH を 6.0 に調整した後、アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0057】

【実施例 9】

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸塩緩衝液濃度を 2 mM に調整し、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加し、 pH を 5.5 に調整した後、アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0058】

【実施例 10】

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸塩緩衝液濃度を 2 mM に調整し、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加し、 pH を 5.0 に調整した後、アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0059】

【実施例 11】

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸塩緩衝液濃度を 0.2 mM に調整し、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加し、 pH を 6.0 に調整した後、アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0060】

【実施例 12】

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸塩緩衝液濃度を 0.2 mM に調整し、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加し、 pH を 5.5 に調整した後、アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0061】

【実施例13】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を0.2mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0062】

【実施例14】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を200mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0063】

【実施例15】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を200mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0064】

【実施例16】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0065】

【実施例17】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し

、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0066】

【実施例18】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0067】

【実施例19】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0068】

【実施例20】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを7.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0069】

【実施例21】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.5に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0070】

【実施例22】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0071】

【実施例23】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように調整し、pHを5.5に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0072】

【実施例24】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを5.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0073】

【実施例25】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、マロン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0074】

【実施例26】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、コハク酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%とな

るように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0075】

【実施例27】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、グルタル酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0076】

【実施例28】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、酒石酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0077】

【実施例29】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、フマル酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0078】

【実施例30】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、リンゴ酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0079】

【実施例31】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、プロピオン酸塩緩衝液

濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0080】

【実施例32】

参考例7のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、クエン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0081】

【実施例33】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、プロピオン酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0082】

【実施例34】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、グルタル酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0083】

【実施例35】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、コハク酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有す

る水溶液注射用製剤を調製した。

【0084】

【実施例36】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酒石酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0085】

【実施例37】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、フマル酸塩緩衝液が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0086】

【実施例38】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、リンゴ酸塩緩衝液が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0087】

【実施例39】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0088】

【実施例40】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（HCO-60）を1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0089】

【実施例41】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（HCO-60）を0.1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0090】

【実施例42】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（商品名：プルロニックF68）を1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0091】

【実施例43】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（プルロニックF68）を0.1%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0092】

【実施例44】

参考例8の、配列番号1の367-480位の114個のアミノ酸からなるトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調

整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0093】

【比較例1】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0094】

【比較例2】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0095】

【比較例3】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を0.2mMに調整し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0096】

【比較例4】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、pHを6.0に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0097】

【比較例5】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度が200mMとなるように調整し、ポリソルベート80 (Tween 80) を0.01%となるように添加し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0098】

【比較例6】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0099】

【比較例7】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0100】

【比較例8】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を20mMに、酢酸塩緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0101】

【比較例9】

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸塩緩衝液濃度を2mMに調整し、pHを7.3に調整した後、アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。

【0102】

【試験例1】

実施例1～4及び比較例1～4の水溶液注射用製剤を、下記測定法1により熱安定性に関する力価の残存率(残存力価%)を測定した。測定法1では、50℃96時間の保存後の力価が66%以上であるものを適と判定した。なおアウレニ

ウスプロットによる予測から、50℃96時間の保存後の力価が66%以上であるものは、5℃保存で80%以上力価を保持している期間が3年と推定される。また、測定法2により振盪安定性試験に関する評価を行った。そして、測定法1と測定法2の測定結果のいずれにおいても満足すべき結果を得たものに対して、総合評価として、適、不適を判断した。

【0103】

その結果を、表1に示す。

【0104】

【表1】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸塩	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸塩	6.0	なし	79.1	白濁			不適
比較例 3	0.2mM リン酸塩	6.0	なし	83.4	白濁	2.930	98.4	不適
実施例 1	0.2mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	84.7	無色 澄明	0.000	100.6	適
実施例 2	0.2mM リン酸塩	6.0	0.1% HCO-60	85.4	無色 澄明	0.002	101.0	適
比較例 4	20mM 酢酸塩	6.0	なし	86.7	白濁	2.930	99.6	不適
実施例 3	20mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	87.8	無色 澄明	0.002	101.8	適
実施例 4	20mM 酢酸塩	6.0	0.1% HCO-60	84.4	無色 澄明	0.002	102.5	適

【0105】

即ち、リン酸塩緩衝液および酢酸塩緩衝液のいずれにおいても、pH6.0においては、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であったが、pH7.

3の比較例1では66%以下であった。また、0.01% Tween 80、又は0.1% HCO-60の界面活性剤が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0106】

<測定法1> 熱安定性試験（50℃で96時間加熱処理）

測定する水溶液注射用製剤を、50℃で96時間加熱処理を行い、以下の手順でトロンボモジュリン力価を測定し、熱処理せずに凍結保存していた試料の力価を100%として、熱処理した試料の力価の残存率（残存力価%）を比較する。

トロンボモジュリン力価の測定は、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用（APCアッセイ法）で測定する。すなわち、100 mMの塩化ナトリウム、3 mMの塩化カルシウム、0.1%のウシ血清アルブミン（シグマ社）、0.225 NIHUのヒトトロンビン（シグマ社）を含む50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.5）37.5 μ Lに、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤から適宜調製した試料溶液5 μ L（但し、試料溶液5 μ L中のトロンボモジュリン量を、0.35～1.4 ngの範囲となるように適宜の希釈率で希釈する）を加えて37℃で15分静置し、約300 μ g/mlのウシプロテインC（ライフテクノロジーズ社）を7.5 μ L添加して37℃で更に30分静置し、プロテインCを活性化させる。次に約100 μ g/mlのヘパリン（和光純薬工業社）と約6 μ g/mlのアンチトロンビンIII（ライフテクノロジーズ社）を含む液7.5 μ Lを添加して反応を停止させる。次に合成基質（BOC-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA）100 μ g/mlを含む基質反応液500 μ Lを添加し、37℃で20分間静置する。酢酸50 μ Lを添加して基質切断反応を停止させる。反応液を蛍光光度計を用いて、励起波長380 nm、発光波長440 nmで蛍光強度を測定し、生成した活性型プロテインC量を求め、更にトロンボモジュリン力価標準品との比較からトロンボモジュリン力価を計算する。

【0107】

<測定法2> 振盪安定性試験（180往復/分の振盪処理）

測定する水溶液注射用製剤を、25℃の恒温振盪機中にて、振幅5 cm、1分

間に180往復の条件で振盪処理を行い、処理前後の外観変化を観察する。必要に応じて濁度（650nmにおける吸光度）及びトロンボモジュリン力価の残存率を測定する。トロンボモジュリン力価の測定法は、測定法1と同一の測定法による。

【0108】

【試験例2】

実施例3、5～13、及び比較例1の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。

その結果を、表2に示す。

【0109】

【表 2】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 の pH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法 1	測定法 2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸塩	7.3	なし	55.4	白濁			不適
実施例 5	200mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	85.4	無色 澄明			適
実施例 3	20mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	87.8	無色 澄明			適
実施例 6	20mM 酢酸塩	5.5	0.01% Tween80	90.3	無色 澄明			適
実施例 7	20mM 酢酸塩	5.0	0.01% Tween80	75.1	無色 澄明			適
実施例 8	2mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	85.4	無色 澄明			適
実施例 9	2mM 酢酸塩	5.5	0.01% Tween80	79.0	無色 澄明			適
実施例 10	2mM 酢酸塩	5.0	0.01% Tween80	75.7	無色 澄明			適
実施例 11	0.2mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	84.4	無色 澄明			適
実施例 12	0.2mM 酢酸塩	5.5	0.01% Tween80	80.9	無色 澄明			適
実施例 13	0.2mM 酢酸塩	5.0	0.01% Tween80	77.4	無色 澄明			適

【0110】

即ち、酢酸塩緩衝液の濃度を 0.2-200mM の広い濃度範囲で振ったが、緩衝液濃度による影響はなく、pH を 5.0-6.0 の範囲にすれば、熱安定性における残存力価はすべて 66% 以上であった。また、0.01% Tween 80 が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0111】

【試験例 3】

実施例 14～19 及び比較例 5～7 の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 および測定法 2 の測定を行い、同様に総合評価を行った。

その結果を、表 3 に示す。

【0112】

【表 3】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時の pH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法 1	測定法 2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 5	200mM リン酸塩	7.3	0.01% Tween80	7.1	無色 澄明			不適
実施例 14	200mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	73.7	無色 澄明			適
実施例 15	200mM リン酸塩	5.0	0.01% Tween80	67.8	無色 澄明			適
比較例 6	20mM リン酸塩	7.3	0.01% Tween80	54.1	無色 澄明			不適
実施例 16	20mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	88.2	無色 澄明			適
実施例 17	20mM リン酸塩	5.0	0.01% Tween80	72.3	無色 澄明			適
比較例 7	2mM リン酸塩	7.3	0.01% Tween80	63.2	無色 澄明			不適
実施例 18	2mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	86.8	無色 澄明			適
実施例 19	2mM リン酸塩	5.0	0.01% Tween80	70.3	無色 澄明			適

【0113】

即ち、リン酸塩緩衝液の濃度を 2-200 mM の広い濃度範囲で振ったところ、pH 7.3 では緩衝液濃度による影響があり、濃度が濃くなるほど力価の低下が見られて 66% を下回ったが（比較例 5～7）、pH を 5.0-6.0 の範囲にすれば、熱安定性における残存力価はすべて 66% 以上であった。また、0.

0.1% Tween 80 が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0114】

【試験例4】

実施例20～24及び比較例1、8の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。

その結果を、表4に示す。

【0115】

【表4】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸塩	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 8	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	7.3	0.01% Tween80	59.8	無色 澄明			不適
実施例 20	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	7.0	0.01% Tween80	68.9	無色 澄明			適
実施例 21	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	6.5	0.01% Tween80	74.2	無色 澄明			適
実施例 22	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	81.3	無色 澄明			適
実施例 23	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	5.5	0.01% Tween80	80.7	無色 澄明			適
実施例 24	20mM リン酸塩 20mM 酢酸塩	5.0	0.01% Tween80	71.3	無色 澄明			適

【0116】

即ち、リン酸塩緩衝液、酢酸塩緩衝液の濃度を共に20mMに調整し、pHを5.0～7.3で振ったところ、pHが5.0～7.0の範囲では、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。pHを5.5～6.5の範囲にすれば、熱安定性における残存力価は73%以上であり、これは5℃保存で80%

以上力価を保持している期間が4年と推定された。特にpH5.5及び6.0での残存力価は80%以上と高かった。一方pH7.3では66%を下回った(比較例1、8)。また、0.01%Tween80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0117】

【試験例5】

実施例25～32及び比較例1、2の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。

その結果を、表5に示す。

【0118】

【表5】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸塩	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸塩	6.0	なし	79.1	白濁			不適
実施例 25	20mM マロン酸塩	6.0	0.01% Tween80	85.9	無色 澄明			適
実施例 26	20mM コハク酸塩	6.0	0.01% Tween80	81.7	無色 澄明			適
実施例 27	20mM ゲルル酸塩	6.0	0.01% Tween80	82.4	無色 澄明			適
実施例 28	20mM 酒石酸塩	6.0	0.01% Tween80	74.5	無色 澄明			適
実施例 29	20mM フマル酸塩	6.0	0.01% Tween80	77.3	無色 澄明			適
実施例 30	20mM リンゴ酸塩	6.0	0.01% Tween80	77.0	無色 澄明			適
実施例 31	20mM アミノ酸塩	6.0	0.01% Tween80	79.2	無色 澄明			適
実施例 32	20mM クエン酸塩	6.0	0.01% Tween80	74.5	無色 澄明			適

【0119】

即ち、緩衝液成分を20mMの各種カルボン酸塩に変えても、pHを6.0に調整すれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、0.01% Tween80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0120】

【試験例6】

実施例33～38及び比較例1、2の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。

その結果を、表6に示す。

【0121】

【表6】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸塩	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸塩	6.0	なし	79.1	白濁			不適
実施例 33	20mM リン酸塩 20mM 7-ヒドロキシ酸塩	6.0	0.01% Tween80	78.0	無色 澄明			適
実施例 34	20mM リン酸塩 20mM グルタミン酸塩	6.0	0.01% Tween80	76.1	無色 澄明			適
実施例 35	20mM リン酸塩 20mM コハク酸塩	6.0	0.01% Tween80	82.1	無色 澄明			適
実施例 36	20mM リン酸塩 20mM 酒石酸塩	6.0	0.01% Tween80	81.3	無色 澄明			適
実施例 37	20mM リン酸塩 20mM フマル酸塩	6.0	0.01% Tween80	72.6	無色 澄明			適
実施例 38	20mM リン酸塩 20mM リンゴ酸塩	6.0	0.01% Tween80	84.3	無色 澄明			適

【0122】

即ち、リン酸塩緩衝液に、各種カルボン酸塩の緩衝液成分を加えても、pHを6.0に調整すれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、0.01% Tween80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

【0123】

【試験例7】

実施例18、39～43及び比較例9の水溶液注射用製剤について、前述の測定法2の測定を行った。

その結果を、表7に示す。

【0124】

【表7】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2		
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)
比較例 9	2mM リン酸塩	7.3	なし		白濁	1.299	90.8
実施例 39	2mM リン酸塩	6.0	0.1% Tween80		無色 澄明	-0.008	97.6
実施例 18	2mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80		無色 澄明	-0.010	87.0
実施例 40	2mM リン酸塩	6.0	1% HCO-60		無色 澄明	0.017	87.8
実施例 41	2mM リン酸塩	6.0	0.1% HCO-60		無色 澄明	-0.003	93.8
実施例 42	2mM リン酸塩	6.0	1% プルロニックF68		無色 澄明	0.010	101.7
実施例 43	2mM リン酸塩	6.0	0.1% プルロニックF68		無色 澄明	-0.004	93.2

【0125】

即ち、界面活性剤の種類と濃度を振って振盪安定性を測定したところ、界面活性剤なしでは外観が白濁し濁度が1.2を超える（比較例9）のに対し、界面活性剤入りでは、白濁が防止された。界面活性剤濃度は、商品名：Tween80は0.1%で、商品名：HCO-60及び商品名：プルロニックF68は0.1%で充分効果があった。

【0126】

【試験例8】

実施例1、3及び比較例6の水溶液注射用製剤について、下記測定法3により加速安定性（20℃保存）に関する残存力価を測定した。

【0127】

【表 8】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 の pH	界面活性剤 濃度、種類	測定法 3 残存力価 (%)		
				0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
比較例 6	20mM リン酸塩	7.3	0.01% Tween80	100	67.1	52.4
実施例 1	0.2mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	100	92.5	73.7
実施例 3	20mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	100	97.5	80.1

【0128】

即ち、比較例 6 では 20℃ 6ヶ月保存後は力価が 52.4%まで低下したが、実施例 1、3 は有意に安定であった。

＜測定法 3＞ 加速安定性試験（20℃で6ヶ月間保存）

測定する水溶液注射用製剤を、20℃で6ヶ月間保存し、トロンボモジュリン力価の残存率を測定する。トロンボモジュリン力価は測定法 1 と同様に測定する。

【0129】

【試験例 9】

実施例 1、3 の水溶液注射用製剤について、下記測定法 4 により長期安定性（5℃保存）に関する残存力価を測定する。トロンボモジュリン力価は測定法 1 と同様に測定する。

【0130】

【表9】

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定法3 残存力価(%)			
				0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
実施例 1	0.2mM リン酸塩	6.0	0.01% Tween80	100	97.3	93.1	97.9
実施例 3	20mM 酢酸塩	6.0	0.01% Tween80	100	105.3	101.5	107.6

【0131】

実施例1、3は5℃9ヶ月保存後も力価の低下見られなかった。

＜測定法4＞ 長期安定性試験（5℃で9ヶ月間保存）

測定する水溶液注射用製剤を、5℃で9ヶ月間保存し、トロンボモジュリン力価の残存率を測定する。トロンボモジュリン力価は試験例1と同様に測定する。

【0132】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：516

配列の型：アミノ酸

配列の種類：蛋白質

配列

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1

5

10

15

Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu

20

25

30

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

35

40

45

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser

50

55

60

Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly

65	70	75	80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys			
	85	90	95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr			
100	105	110	
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn			
115	120	125	
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu			
130	135	140	
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val			
145	150	155	160
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg			
165	170	175	
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr			
180	185	190	
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro			
195	200	205	
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys			
210	215	220	
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro			
225	230	235	240
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys			
245	250	255	
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala			
260	265	270	
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys			
275	280	285	
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly			
290	295	300	

Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly
 515

配列の長さ：516

配列の型：アミノ酸

配列の種類：蛋白質

配列

Met	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly
1				5					10					15	
Phe	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Cys	Val	Glu
				20				25					30		
His	Asp	Cys	Phe	Ala	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Asn	Ala
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Met	Thr	Val	Arg	Ser
		50				55					60				
Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly
	65				70				75					80	
Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Cys
				85				90						95	
Gly	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	Gly	Phe	Gln	Trp	Val	Thr
		100					105						110		
Gly	Asp	Asn	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ser	Arg	Trp	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Asn
		115					120					125			
Gly	Ala	Pro	Leu	Cys	Gly	Pro	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Glu
	130					135					140				
Ala	Thr	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Ile	Trp	Glu	Glu	Gln	Gln	Cys	Glu	Val
145					150				155					160	
Lys	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Cys	Glu	Phe	His	Phe	Pro	Ala	Thr	Cys	Arg
				165				170					175		
Pro	Leu	Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Thr
		180					185						190		
Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Phe	Gln	Ala	Leu	Pro

195	200	205
Val Gly Ser Ser Ala Ala	Val Ala Pro Leu Gly Leu	Gln Leu Met Cys
210	215	220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val	Gln Gly His Trp Ala Arg	Glu Ala Pro
225	230	235
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val	Glu Asn Gly Gly Cys Glu	His Ala Cys
245	250	255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro	Arg Cys Gln Cys Pro Ala	Gly Ala Ala
260	265	270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser	Cys Thr Ala Ser Ala Thr	Gln Ser Cys
275	280	285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe	Cys Val Pro Asn Pro Asp	Gln Pro Gly
290	295	300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu	Thr Gly Tyr Arg Leu Ala	Ala Asp Gln
305	310	315
His Arg Cys Glu Asp Val Asp	Asp Cys Ile Leu Glu Pro	Ser Pro Cys
325	330	335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr	Gln Gly Gly Phe Glu Cys	His Cys Tyr
340	345	350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp	Gly Glu Cys Val Glu Pro	Val Asp Pro
355	360	365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu	Tyr Gln Cys Gln Pro Leu	Asn Gln Thr
370	375	380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala	Glu Gly Phe Ala Pro Ile	Pro His Glu
385	390	395
Pro His Arg Cys Gln Met Phe	Cys Asn Gln Thr Ala Cys	Pro Ala Asp
405	410	415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala	Ser Cys Glu Cys Pro Glu	Gly Tyr Ile
420	425	430

Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly

435

440

445

Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys

450

455

460

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys

465

470

475

480

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro

485

490

495

Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu

500

505

510

Val His Ser Gly

515

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 5 4 8

配列の型 : 塩基配列

配列の種類 : DNA

配列

ATG CTT GGG GTC CTG GTC CTT GGC GCG CTG GCC CTG GCC GGC CTG GGG	48
TTC CCC GCA CCC GCA GAG CCG CAG CCG GGT GGC AGC CAG TGC GTC GAG	96
CAC GAC TGC TTC GCG CTC TAC CCG GGC CCC GCG ACC TTC CTC AAT GCC	144
AGT CAG ATC TGC GAC GGA CTG CGG GGC CAC CTA ATG ACA GTG CGC TCC	192
TCG GTG GCT GCC GAT GTC ATT TCC TTG CTA CTG AAC GGC GAC GGC GGC	240
GTT GGC CGC CGG CGC CTC TGG ATC GGC CTG CAG CTG CCA CCC GGC TGC	288
GGC GAC CCC AAG CGC CTC GGG CCC CTG CGC GGC TTC CAG TGG GTT ACG	336
GGA GAC AAC AAC ACC AGC TAT AGC AGG TGG GCA CGG CTC GAC CTC AAT	384
GGG GCT CCC CTC TGC GGC CCG TTG TGC GTC GCT GTC TCC GCT GCT GAG	432
GCC ACT GTG CCC AGC GAG CCG ATC TGG GAG GAG CAG CAG TGC GAA GTG	480
AAG GCC GAT GGC TTC CTC TGC GAG TTC CAC TTC CCA GCC ACC TGC AGG	528
CCA CTG GCT GTG GAG CCC GGC GCC GCG GCT GCC GCC GTC TCG ATC ACC	576

TAC GGC ACC CCG TTC GCG GCC CGC GGA GCG GAC TTC CAG GCG CTG CCG	624
GTG GGC AGC TCC GCC GCG GTG GCT CCC CTC GGC TTA CAG CTA ATG TGC	672
ACC GCG CCG CCC GGA GCG GTC CAG GGG CAC TGG GCC AGG GAG GCG CCG	720
GGC GCT TGG GAC TGC AGC GTG GAG AAC GGC GGC TGC GAG CAC GCG TGC	768
AAT GCG ATC CCT GGG GCT CCC CGC TGC CAG TGC CCA GCC GGC GCC GCC	816
CTG CAG GCA GAC GGG CGC TCC TGC ACC GCA TCC GCG ACG CAG TCC TGC	864
AAC GAC CTC TGC GAG CAC TTC TGC GTT CCC AAC CCC GAC CAG CCG GGC	912
TCC TAC TCG TGC ATG TGC GAG ACC GGC TAC CGG CTG GCG GCC GAC CAA	960
CAC CGG TGC GAG GAC GTG GAT GAC TGC ATA CTG GAG CCC AGT CCG TGT	1008
CCG CAG CGC TGT GTC AAC ACA CAG GGT GGC TTC GAG TGC CAC TGC TAC	1056
CCT AAC TAC GAC CTG GTG GAC GGC GAG TGT GTG GAG CCC GTG GAC CCG	1104
TGC TTC AGA GCC AAC TGC GAG TAC CAG TGC CAG CCC CTG AAC CAA ACT	1152
AGC TAC CTC TGC GTC TGC GCC GAG GGC TTC GCG CCC ATT CCC CAC GAG	1200
CCG CAC AGG TGC CAG ATG TTT TGC AAC CAG ACT GCC TGT CCA GCC GAC	1248
TGC GAC CCC AAC ACC CAG GCT AGC TGT GAG TGC CCT GAA GGC TAC ATC	1296
CTG GAC GAC GGT TTC ATC TGC ACG GAC ATC GAC GAG TGC GAA AAC GGC	1344
GGC TTC TGC TCC GGG GTG TGC CAC AAC CTC CCC GGT ACC TTC GAG TGC	1392
ATC TGC GGG CCC GAC TCG GCC CTT GTC CGC CAC ATT GGC ACC GAC TGT	1440
GAC TCC GGC AAG GTG GAC GGT GGC GAC AGC GGC TCT GGC GAG CCC CCG	1488
CCC AGC CCG ACG CCC GGC TCC ACC TTG ACT CCT CCG GCC GTG GGG CTC	1536
GTG CAT TCG GGC	1548

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 5 4 8

配列の型 : 塩基配列

配列の種類 : DNA

配列

ATG CTT GGG GTC CTG GTC CTT GGC GCG CTG GCC CTG GCC GGC CTG GGG	48
TTC CCC GCA CCC GCA GAG CCG CAG CCG GGT GGC AGC CAG TGC GTC GAG	96
CAC GAC TGC TTC GCG CTC TAC CCG GGC CCC GCG ACC TTC CTC AAT GCC	144

AGT CAG ATC TGC GAC GGA CTG CGG GGC CAC CTA ATG ACA GTG CGC TCC	192
TCG GTG GCT GCC GAT GTC ATT TCC TTG CTA CTG AAC GGC GAC GGC GGC	240
GTT GGC CGC CGG CGC CTC TGG ATC GGC CTG CAG CTG CCA CCC GGC TGC	288
GGC GAC CCC AAG CGC CTC GGG CCC CTG CGC GGC TTC CAG TGG GTT ACG	336
GGA GAC AAC AAC ACC AGC TAT AGC AGG TGG GCA CGG CTC GAC CTC AAT	384
GGG GCT CCC CTC TGC GGC CCG TTG TGC GTC GCT GTC TCC GCT GCT GAG	432
GCC ACT GTG CCC AGC GAG CCG ATC TGG GAG GAG CAG CAG TGC GAA GTG	480
AAG GCC GAT GGC TTC CTC TGC GAG TTC CAC TTC CCA GCC ACC TGC AGG	528
CCA CTG GCT GTG GAG CCC GGC GCC GCG GCT GCC GCC GTC TCG ATC ACC	576
TAC GGC ACC CCG TTC GCG GCC CGC GGA GCG GAC TTC CAG GCG CTG CCG	624
GTG GGC AGC TCC GCC GCG GTG GCT CCC CTC GGC TTA CAG CTA ATG TGC	672
ACC GCG CCG CCC GGA GCG GTC CAG GGG CAC TGG GCC AGG GAG GCG CCG	720
GGC GCT TGG GAC TGC AGC GTG GAG AAC GGC GGC TGC GAG CAC GCG TGC	768
AAT GCG ATC CCT GGG GCT CCC CGC TGC CAG TGC CCA GCC GGC GCC GCC	816
CTG CAG GCA GAC GGG CGC TCC TGC ACC GCA TCC GCG ACG CAG TCC TGC	864
AAC GAC CTC TGC GAG CAC TTC TGC GTT CCC AAC CCC GAC CAG CCG GGC	912
TCC TAC TCG TGC ATG TGC GAG ACC GGC TAC CGG CTG GCG GCC GAC CAA	960
CAC CGG TGC GAG GAC GTG GAT GAC TGC ATA CTG GAG CCC AGT CCG TGT	1008
CCG CAG CGC TGT GTC AAC ACA CAG GGT GGC TTC GAG TGC CAC TGC TAC	1056
CCT AAC TAC GAC CTG GTG GAC GGC GAG TGT GTG GAG CCC GTG GAC CCG	1104
TGC TTC AGA GCC AAC TGC GAG TAC CAG TGC CAG CCC CTG AAC CAA ACT	1152
AGC TAC CTC TGC GTC TGC GCC GAG GGC TTC GCG CCC ATT CCC CAC GAG	1200
CCG CAC AGG TGC CAG ATG TTT TGC AAC CAG ACT GCC TGT CCA GCC GAC	1248
TGC GAC CCC AAC ACC CAG GCT AGC TGT GAG TGC CCT GAA GGC TAC ATC	1296
CTG GAC GAC GGT TTC ATC TGC ACG GAC ATC GAC GAG TGC GAA AAC GGC	1344
GGC TTC TGC TCC GGG GTG TGC CAC AAC CTC CCC GGT ACC TTC GAG TGC	1392
ATC TGC GGG CCC GAC TCG GCC CTT GCC CGC CAC ATT GGC ACC GAC TGT	1440
GAC TCC GGC AAG GTG GAC GGT GGC GAC AGC GGC TCT GGC GAG CCC CCG	1488
CCC AGC CCG ACG CCC GGC TCC ACC TTG ACT CCT CCG GCC GTG GGG CTC	1536

GTG CAT TCG GGC

1548

配列番号 : 5

配列の長さ : 21

配列の型 : 塩基配列

配列の種類 : DNA

配列

AATGTGGCGG GCAAGGGCCG A

21

【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5～7.0において緩衝能を有する緩衝液成分と界面活性剤とを含有し、pH 5～7.0であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れた水溶液注射用製剤が提供される。

【効果】 使用時に溶解する手間のかからない長期安定性および振盪安定性に優れた水溶液注射用製剤が提供される。

【選択図】 選択図なし

特平 9-281659

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000000033
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

特平 9-281659

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名 旭化成工業株式会社